

A N-serve és a nátrium-azid hatása endoszimbionta Rhizobiumok szaporodására és légzésére

¹H. A. E. F. BAYOUMI HAMUDA, ²KISS ZITA, ²VÁRADY GYÖRGY,
¹BALÁZSY SÁNDOR, ²KUCSMA NÓRA és ²KECSKÉS MIHÁLY

¹Bessenyei György Tanárképző Főiskola, Nyíregyháza és
²Gödöllői Agrártudományi Egyetem

Bevezetés

A N-serve az ammónium oxidációnál gátolja speciálisan a nitrifikációt. 1 mg/l koncentráció felett a N-serve lizálja a nitrifikáló baktériumokat. Azt is feltételezik, hogy alacsony koncentrációnál (~ 0,5 mg/l) a nitrifikációs enzimek kelátot képeznek (HUGHES & WELCH, 1970b; HENDRICKSON & KEENEY, 1979; ZACHERL & AMBERGER, 1990a). Egyes szerzők (BENMOUSSA et al., 1984; PRISCU et al., 1990) szerint a N-serve főleg a kemoautotróf mikrobákra hat gátlólag és úgy tűnik, hogy speciális környezeti tényezők jelenlétében sokkal hatékonyabb (HENDRICKSON & KEENEY, 1979). BAYOUMI HAMUDA (1987, 1992) és BAYOUMI HAMUDA et al. (1988) megállapították, hogy a N-serve (nitrapyrin) toxikus hatással van néhány gyors növekedésű Rhizobium fajra. ZACHERI & AMBERGER (1990b) kimutatta, hogy a nitrifikáció gátlásának legfontosabb előfeltétele a *Nitrosomonas europaea* jelenléte (GORING, 1962; SHATTUCK & ALEXANDER, 1963; HUGHES & WELCH, 1970b), ami a nitrifikáció első lépcsőfokát végzi. BHOLDEBARIN & OERTIL (1994) megállapította, hogy az irodalomban a fenolvegyületek nitrifikációt gátló hatása az NH_4 fixációjában és a NO_2 volatilizációjában nyilvánul meg. Az ilyen kemikáliák gátolják a nitrifikálók tápanyagfelvételét.

ZACHERI & AMBERGER (1990b) arra a következtetésre jutott, hogy a N-serve jelentéktelen hatással van a *R. leguminosarum*-ra és nem felel meg az ökológiai követelményeknek, mivel különösen csak a *Nitrosomonas* fajt gátolja.

HUGHES & WELCH (1970a) kálium-azidot használt nitrifikáció gátlóként. A nátrium-azid a légzési folyamatok speciális inhibitora. Gátolja a mikrobák szaporodását is, mivel a citokrómot használja elektron transzferként.

Munkánk célja volt demonstrálni a N-serve és a nátrium-azid hatását a különböző Rhizobium törzsek szaporodására és légzésére.

Anyag és módszer

Hét *Rhizobium* törzset használtunk, melyek a *Rhizobium* genus négy faját képviselték. In vitro tesztelés után ezen törzsek (1. táblázat) biotrágya komponensként való felhasználását tervezzük szántóföldi körülmények között. A törzseket élesztőkivonat-mannitol (YEM) agaron tartottuk fenn, melyhez használat előtt 3 g/l CaCO_3 -ot adtunk (KLECZKOWSKA et al., 1968).

1. táblázat
A vizsgált *Rhizobium* törzsek adatai

(1) Rhizobium fajok	(2) Laboratóriumi kód	(3) Gazdanövény	(4) Eredet
<i>R. leguminosarum</i>	HB-3841* E 1012 Lóbab Z Bükköny 75/4	<i>Vicia faba</i>	a) Líbia b) Anglia c) Magyarország c) Magyarország
<i>R. phaseoli</i>	Bab 5/3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	c) Magyarország
<i>R. trifolii</i>	L6 133/64	<i>Trifolium pratense</i>	c) Magyarország
<i>R. loti</i>	Baltacim-3	<i>Onohrychis viciaefolia</i>	c) Magyarország

*streptomycin rezisztens mutáns (240 µg/ml)

A *Rhizobium* törzsek szaporodása

A *Rhizobium* törzsek N-serve [2-klór-6-(triklórmetil)-piridin] toleranciáját vizsgáltuk 0, 0,1, 1, 10 és 100 mg/l koncentrációkban 5 ml YEM tápoldatban. A nátrium-azidot (NaN_3) 0, 10, 20, 30, 40 és 50 mM-os koncentrációkban vizsgáltuk módosított YEM tápoldatban, melyből a szervesen összetevők hiányoztak (BAYOUMI HAMUDA, 1992). A csöveket három ismétlésben, 125 µl baktérium szuszpenzióval (10^6 sejt/ml) oltottuk és rázógépen (150 ford./perc) 28 °C-on, 48 órán át inkubáltuk. A szaporodás mértékét DR-2000 típusú spektrofotométerrel mértük 550 nm-es hullámhossznál.

A *Rhizobium* törzsek légzése

A *Rhizobium* törzsek a YEM tápoldatban 28 °C-on, 30 órán át szaporodtak a késői log fázisig. A sejteket 10 percig centrifugáltuk 4000-es fordulatszámra. A sejtömeget kétszer átmostuk 0,1 M-os foszfát-pufferrel (pH=7,2). Ebből a szuszpenzióból állítottuk be a törzsek optikai sejtűrségét 1-re 550 nm-en. A *Rhizobium* sejtek légzési aktivitását is mértük a Warburg-féle mérővel az UMBREIT et al. által leírt módszerrel (1964).

A respirométer reakciós edényébe az 1 ml szuszpenzió kívül 0,5 ml 1 %-os glükóz oldatot (amely elősegítette a légzést), különböző koncentrációjú N-servet vagy nátrium-azidot is tettünk. A központi cellába 0,2 ml 40 %-os KOH-ot öntöttünk. A 30 perces egyensúlyi szakasz után az elfogyasztott oxigén mennyiségét 180 percen át 15 percenként mértük. A mérések 28 °C-on háromszoros ismétlésben történtek. Az oxigénfogyasztást $\mu\text{l/g}$ sejtsszárazanyagra kalkuláltuk.

Statisztikai analízis

A kapott mérési eredményeket a kontrollhoz viszonyított relatív növekedési ráta formájában tüntettük fel. A törzsenkénti és kezelésenkénti három ismétlés átlagát ANOVA analízissel elemeztük és $P = 0,05$ szinten meghatároztuk a kezelések közötti statisztikai különbségeket.

Eredmények

A N-serve és a nátrium-azid hatása a Rhizobium törzsek szaporodására a 2. és 3. táblázatban látható. A törzsek tolerálták az alacsonyabb koncentrációkat, míg a 10 mg/l-es N-serve koncentráció kedvezőtlenül hatott a szaporodásra. A 100 mg/l-es dózis 42 %-kal és 85 %-kal csökkentette a Lóbab Z és a Bükköny 75/4 szaporodását, ugyanakkor a többi törzset 100 %-ban gátolta. A tolerancia mértéke a következőképpen csökkent: Lóbab Z > Bab 5/3 > Baltacim-3 > E1012 > Bükköny 75/4 > Ló 133/64 > HB-3841. A 10 mM-os NaN_3 az összes

2. táblázat

Különböző N-serve koncentrációk hatása Rhizobium törzsek relatív szaporodási rátájára (a kontroll százalékában) YEM tápközegben rázógépből
(150 ford./perc) 28 °C-on 48 óra alatt

(1) Rhizobium törzsek	(2) Koncentrációk ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)			
	0,1	1,0	10	100
HB-3841	82,88±6,8	62,16±5,1*	49,10±10,1*	0,00*
Lóbab Z	93,48±2,5	71,38±2,1	67,39±4,3*	57,97±6,1*
Bükköny 75/4	90,82±6,0	75,63±5,0	37,34±10*	15,19±15*
E1012	83,33±6,7	78,13±5,6	64,58±11,1*	0,00*
Bab 5/3	88,79±7,2	79,44±5,8	71,03±12	0,00*
Ló 133/64	79,17±6,3	71,88±5,3	65,63±10,3*	0,00*
Baltacim-3	92,11±7,5	87,72±6,1	50,88±12,2*	0,00*

*szignifikáns eltérés $P = 0,05$ szinten, SzD = 31,758

3. táblázat

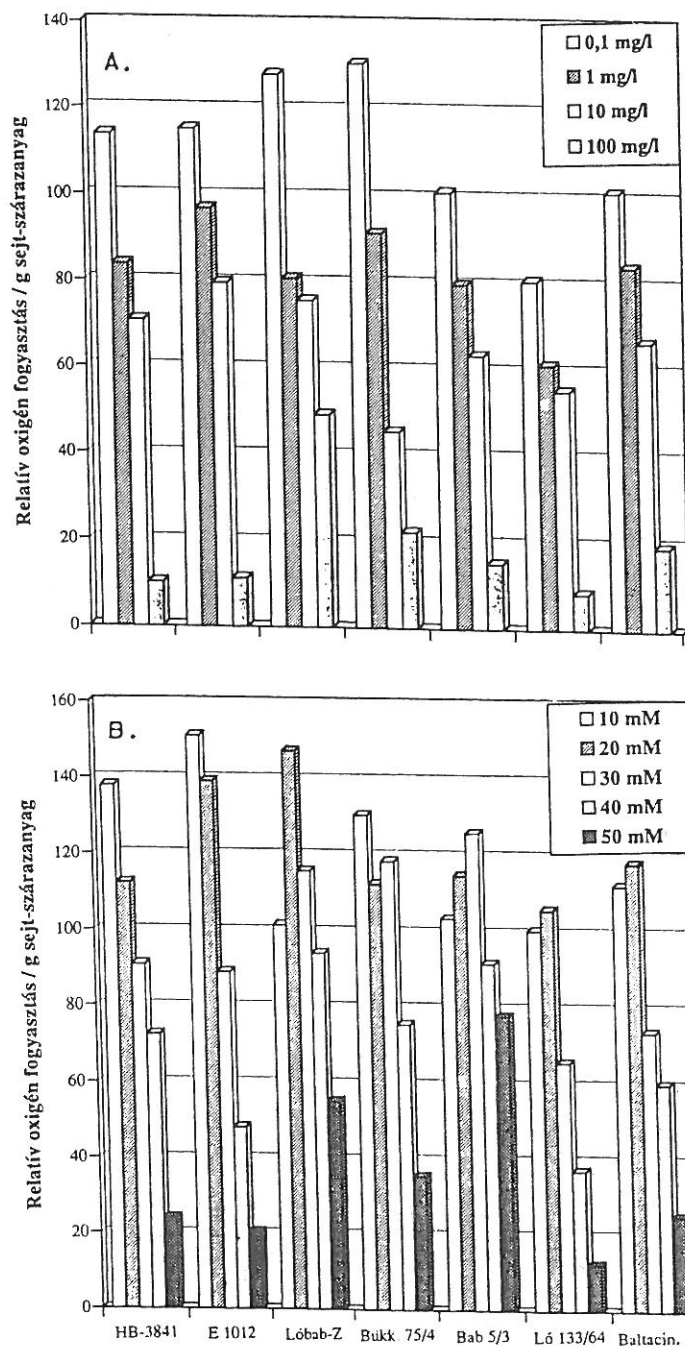
Különböző nátrium-azid koncentrációk hatása *Rhizobium* törzsek relatív szaporodási rátájára (a kontroll százalékában) YEM tápközegben rázógéppben (150 ford./perc) 28 °C-on 48 óra alatt

(1) Rhizo- bium törzsek	(2) Koncentrációk (mg·l ⁻¹)				
	10	20	30	40	50
HB-3841	101,13±6,7	87,57±5,6	50,92±11,4*	30,15±8,1*	12,73±34,1*
Lóbab Z	102,46±8,4	149,02±7,2*	93,50±14,3	75,10±10,3	25,00±5,3*
Bükköny 75/4	153,57±10,3*	125,00±9,0	83,57±17,4	35,71±13,8*	10,50±6,1*
E1012	100±5,7	75,00±4,5	57,14±9,2	35,71±6,4*	18,45±4,2*
Bab 5/3	158,06±8,0*	125,81±6,3	103,23±13,3	80,65±9,8	43,05±4,2*
Ló 133/64	120,47±8,8	82,68±7,5	35,43±14,8*	15,10±10,1*	0,00*
Baltacim-3	139,33±9,5	97,50±8,1	52,50±15,2*	35,70±11,3*	12,30±5,6*

*szignifikáns eltérés P = 0,05 szinten, SzD = 45,895

törzs szaporodását szignifikánsan stimulálta a kontrollhoz képest. 20 mM-os koncentrációnál csak a Lóbab Z, Bükköny 75/4 és Bab 5/3 törzseknél tapasztaltunk serkentést, a többire gátlólag hatott. Az összes törzs szaporodása szignifikánsan gátolt volt 40 és 50 mM NaN₃-koncentrációnál. Eredményeink szerint a tesztelt *Rhizobium* törzsek légzése a gátló anyagok alkalmazásakor gyengült. A tesztelt hét *Rhizobium* törzs légzési rátája (glükóz-oxidáció), a 180 perces O₂-fogyasztás alapján 0,1 mg/l N-serve jelenlétében emelkedett (kivéve a *R. trifolii* fajhoz tartozó Ló 133/64 törzset). Ugyanezt tapasztaltuk a 10 és 20 mM koncentrációjú nátrium-azid alkalmazásakor. Az 1. (A, B) ábrán látható, hogy az elfogyasztott oxigénmennyiség/gramm sejtszárazanyag értéke az alkalmazott szerek koncentrációjának növekedésével csökkent (0,1 mg/l N-serve és 20 mM NaN₃ felett). A *Rhizobium* fajokat összehasonlítva megállapítható, hogy a *R. trifolii* légzése érzékenyebb volt a gátló anyagokra, ami azt jelenti, hogy a három órán túli O₂-fogyasztást a N-serve 92 %-kal, a NaN₃ 89 %-kal csökkentette. Ez valószínű a vizsgálat kezdetén stagnáló légzésnek tulajdonítható. Ez a következtetés a Lóbab Z-t (*R. leguminosarum* törzs) kivéve valamennyi törzsre fennáll. A 100 mg/l-es N-serve koncentrációnál 5 %-os szignifikancia szinten a relatív O₂-fogyasztás/gramm sejtszárazanyag szignifikánsan eltért a nem kezelt kultúrákban.

A 30 mM-os NaN₃-adagolásakor a Lóbab Z, Bükköny 75/4 (*R. leguminosarum*) és a Bab 5/3 (*R. phaseoli*) légzés intenzívebb volt a kezeletlen kultúráknál. A kezdeti lag fázisai is gyorsabbak voltak. A legnagyobb NaN₃-koncentrációnál a légzési intenzitás %-os szignifikancia szinten mutatta a legnagyobb eltérést a kontrollhoz képest. Megfigyeltük, hogy a Lóbab Z törzs adaptálódott leginkább a gátló anyagokhoz.



1. ábra

Rhizobium törzsek relatív oxigén fogyasztása három óra alatt Warburg-féle párologásmérővel mérve Na-serve (A), ill. Na-azid (B) hatására

Eredmények megvitatása

A N-serve és a NaN_3 hét *Rhizobium* törzs szaporodására gyakorolt hatása nem fedi a ZACHERL & AMBERGER (1990b) által leírtakat. Szerintük a 100 ppm N-serve csak 17 %-kal csökkentette a *R. leguminosarum* szaporodását. Eredményeink szerint a gátlás 42 %-os volt a Lóbab Z és 85 %-os a Bükköny 75/4 törzsnél. A *R. leguminosarum* HB-3841 és E1012 törzseinél és a többi *Rhizobium* fajnál 100 %-os volt a gátlás ugyanannál a koncentrációnál. Több információ nem áll rendelkezésre a NaN_3 *Rhizobium*ra vagy más N_2 -fixálóra gyakorolt hatásáról.

A vizsgált és mért adataink alapján megalapozott dolog vitatkozni ZACHERL & AMBERGER (1990b) megállapításaival. A légzést, mint a legérzékenyebb paramétert választották a mérésekhez, mivel a N_2 -fixáló mikroszimbionta baktériumoknak igen intenzív a légzése a nagy energiabefektetést igénylő N_2 redukálás miatt. Így a nitrifikációgátlók által kiváltott légzéscsökkenés is megjelenik a N_2 -fixáció csökkenésében. Ennek a folyamatnak kellene lejátszódnia a NaN_3 , mint légzésgátló esetében is. Laboratóriumi eredményeinkkel kimutattuk, hogy 0,1 mg/l-es N-serve nem, míg a 10 és 100 mg/l-es igen toxikusan hat a vizsgált *Rhizobium* törzsekre. A 10 és 20 mM-os nátrium-azid fokozta a törzsek légzését, az 50 mM-os dózis pedig toxikus volt a Lóbab Z és Bab 5/3 törzseket kivéve. ZACHERL & AMBERGER (1990b) szerint a N-serve csak kismértékben hat a *Rhizobium*ra. Az eredményeink alapján a hatás lehet pozitív vagy negatív. Ez függ: 1) a törzstől, 2) a táptalajtól, 3) a tenyészet mikrokozmoszától és 4) a vegyületek adagjától. A lag fázis elhúzódása a legnagyobb koncentrációban jelenlévő inhibitoroknál jelezheti a törzsek lehetséges adaptációját vagy toleranciáját ezekhez a gátló anyagokhoz. Ez a *R. leguminosarum* törzsek esetében tisztázott. Az irodalmi utalások nagyon szegényesek, ez további kutatásokat tesz szükségessé.

Összefoglalás

A táptalajhoz adagolt különböző koncentrációjú N-serve (0, 0,1, 1, 10 és 100 mg/l) és Na-azid (0, 10, 20, 30, 40 és 50 mM) befolyásolta hét *Rhizobium* törzs (*R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifolii* és *R. loti*) szaporodását. Az inkubáció 28 °C-on, rázógépen rázatva (150 ford./perc), 48 órán át tartott. A N-serve minden alkalmazott koncentrációja gátló hatású volt valamennyi fajra nézve. A Warburg-féle párolgásmérővel történt mérés alapján a 0,1 mg/l N-serve koncentráció fokozta a légzést. A 10 és 100 mg/l-es dózis szignifikánsan toxikus volt és 180 percen belül csökkentette a *Rhizobium* törzsek légzési rátáját. A 10 mM-os NaN_3 serkentette a törzsek szaporodását és légzését. A *R. leguminosarum* törzseket (Lóbab Z and Bükköny 75/4) a 20 mM-os, a *R. phaseolit* (Bab 5/3 törzs) a 30 mM-os NaN_3 stimulálta. A *Rhizobium* törzsek szaporodását és légzését szignifikánsan csökkentette az NaN_3 50 mM-os kon-

centrációja. A Lóbab Z, Bükköny 75/4 és Bab 5/3 törzsek légzési rátája 30 mM-os NaN_3 -nál nagyobb volt, mint a nem kezelt kultúrákban. 5 %-os szignifikancia szintnél az 50 mM-os NaN_3 szignifikánsan gátolta a *Rhizobium* törzsek légzését.

Irodalom

- BAYOUMI HAMUDA, H. E. A. F., 1987. Pesticide and antibiotic sensitivity of *Rhizobium leguminosarum* strains. University Doctor Diss., Gödöllő University of Agricultural Sciences.
- BAYOUMI HAMUDA, H. E. A. F., 1992. Factors influencing the optimization of *Rhizobium leguminosarum* and *Vicia faba* symbiosis. Candidate of Biological Sciences Dissertation, Hungarian Academy of Sciences, Budapest.
- BAYOUMI HAMUDA, H. E. A. F., TIMÁRI, S. & KECSKÉS, M., 1988. Side-effect of different pesticides on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strains. *Acta Microbiol. Hung.* 35. 161.
- BENMOUSSA, H., FORTIN, N. & MARTIN, G., 1984. Effect of a specific inhibitor of nitrification: 2-chloro-6-trichloromethyl pyridine (N-serve). *Rev. Fr. Sci. Eau.* 3. 137-146.
- BHOLDEBARIN, B. & OERTIL, J. J., 1994. Nitrification: Interference by phenolic compounds. *J. Plant Nutr.* 17. 1827-1837.
- GORING, C. A. J., 1962. Control of nitrification by 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine. *Soil Sci.* 93. 211-218.
- HENDRICKSON, L. L. & KEENEY, D. R., 1979. A bioassay to determine the effect of organic matter and pH on the effectiveness of nitrapyrin (N-serve) as a nitrification inhibitor. *Soil Biol. Biochem.* 11. 51-55.
- HUGHES, T. D. & WELCH, L. F., 1970a. Potassium azide as a nitrification inhibitor. *Agron. J.* 62. 595-599.
- HUGHES, T. D. & WELCH, L. F., 1990b. 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine as a nitrification inhibitor for anhydrous ammonia applied in different seasons. *Agron. J.* 62. 821-824.
- KLECZKOWSKA, J. et al., 1968. The identification and classification of *Rhizobium*. In: Identification methods for microbiologists, part B. (Eds. GIBBS, B. W. M. & SHAPTON, D. A.). 51-65. Academic Press. London.
- PRISCU, J. C. et al., 1990. Dynamics of ammonium oxidizer activity and nitrous oxide (N_2O) within and beneath Antarctic sea ice. *Marine Ecol. Prog. Ser.* 62. 37-46.
- SHATTUCK, G. E. JR. & ALEXANDER, M., 1963. A Differential inhibitor of nitrifying microorganisms. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 27. 600-601.
- UMBREIT, W. W., BURRIES, R. H. & STAUFFER, J. F., 1964. Manometric Technique. 4th Ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis.
- ZACHERI, B. & AMBERGER, A., 1990a. Effect of nitrification inhibitors dicyandiamide (DCD), nitrapyrin (N-serve) and thiourea (TU) on growth and metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Fert. Res.* 22. 37-44.
- ZACHERI, B. & AMBERGER, A., 1990b. Effect of nitrification inhibitors on N-fixing bacteria *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter chroococcum*. *Fert. Res.* 22. 137-139.

Érkezett: 1995. június 16.

Effect of N-serve and Na-azide on the Growth and Respiration of Endosymbiotic N₂-fixing Bacteria

¹ H. A. E. F. BAYOUMI HAMUDA, ² Z. KISS, ² G. VÁRADY, ¹ S. BALÁZSY,
² N. KUČSMA and ² M. KECSKÉS

¹ Bessenyei György Teachers Training College, Nyíregyháza and
² University of Agricultural Sciences, Gödöllő

Summary

The addition of various concentrations of N-serve (0, 0.1, 1, 10 and 100 mg/l) and Na-azide (0, 10, 20, 30, 40 and 50 mM) to the nutrient medium influenced the growth of seven *Rhizobium* strains (*R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifolii* and *R. loti*). Incubation took place at 28 °C in a rotary shaker (150 r.p.m.) for 48 hours. All the concentrations of N-serve applied had an inhibitory effect on all the species. Measurements carried out with a Warburg respirometer showed that a concentration of 0.1 mg/l N-serve enhanced respiration. The 10 and 100 mg/l rates were significantly toxic and reduced the respiration rate of the *Rhizobium* strains within 180 min. A 10 mM rate of NaN₃ stimulated the growth and respiration of the strains. The *R. leguminosarum* strains (Horsebean Z and Vetch 75/4) were stimulated by 20 mM NaN₃ and *R. phaseoli* by 30 mM. The growth and respiration of the *Rhizobium* strains was significantly reduced by the 50 mM concentration of NaN₃. The respiration rates of the Horsebean Z, Vetch 75/4 and Bean 5/3 strains were higher in the 30 mM NaN₃ treatment than in untreated cultures. The 50 mM NaN₃ rate significantly inhibited the respiration of the *Rhizobium* strains at the 5 % level of significance.

Table 1. Data on the *Rhizobium* strains tested. (1) *Rhizobium* species. (2) Laboratory code. (3) Host plant. (4) Origin. a) Lybia, b) U.K., c) Hungary. *Streptomycin-resistant mutant (240 µg/ml).

Table 2. Effect of various concentrations of N-serve on the relative growth rate of *Rhizobium* strains on YEM nutrient medium in a rotary shaker (150 r.p.m.) at 28 °C during a 48-hour period. (1) *Rhizobium* strains. (2) Concentrations, mg/l. *Significant deviation $P = 0.05$, LSD = 31.758.

Table 3. Effect of various Na-azide concentrations on the relative growth rate of *Rhizobium* strains on YEM nutrient medium in a rotary shaker (150 r.p.m.) at 28 °C during a 48-hour period. (1) *Rhizobium* strains. (2) Concentrations, mg/l. *Significant deviation $P = 0.05$, LSD = 45.895.

Fig. 1. Relative oxygen consumption of *Rhizobium* strains as affected by N-serve (A) and Na-azide (B) measured for three hours with a Warburg respirometer. Vertical axis: Relative oxygen consumption/g cell dry matter. Horizontal axis: *Rhizobium* strains.